

# **DIPLOMADOLGOZAT**

**Páli Petra**

**2025.**



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**  
**Budai Campus**  
**Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet**  
**Élelmiszerbiztonsági- és minőségi mérnöki**  
**mesterképzési szak**

**Mintaelőkészítési módszer validálása patulin vizsgálatához,  
különböző élelmiszermintákból, folyadékkromatográfiás,  
tandem tömegspektrometriás méréshez**

**Belső konzulens:** Dr. Abrankó László  
tanszékvezető, egyetemi tanár

**Belső konzulens  
intézete/tanszéke:** Élelmiszerkémia és Analitika  
Tanszék

**Készítette:** Páli Petra

**Budapest**  
**2025.**

## TITKOSÍTÁSI KÉRELEM

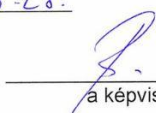
Alulírott Páli Petra (Neptun-kód: HREXS3) Élelmiszerbiztonsági- és minőségi mérnöki Msc. szak hallgatója kérelmezem, hogy a *Mintaelőkészítési módszer validálása patulin vizsgálatához, különböző élelmiszermintákból, folyadékkromatográfiás, tandem tömegspektrometriás méréshez* című diplomadolgozatom (konzulens(ek) neve: Dr. Abrankó László) a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Tanulmányi és Vizsgaszabályzat (a továbbiakban: TVSZ) 95. § (5) bek. c) pontja alkalmazásával titkosításra kerüljön. Tudomásul veszem, hogy kérelmem jóváhagyása esetén a dolgozat titkosítása a TVSZ 95. § (5) bek. c) pontja alapján a sikeres védést követő 5 évre szól.

Kelt: Budapest, 2025.10.28

  
a hallgató aláírása

Alulírott Balázs Gábor, mint a Eurofins Food & Feed Testing Budapest Kft., 1045 Budapest, Anonymus utca 6. képviselője kérem a Eurofins Food & Feed Testing Budapest Kft. által nyújtott adatok felhasználásával Páli Petra (Neptun-kód: HREXS3) által készített, *Mintaelőkészítési módszer validálása patulin vizsgálatához, különböző élelmiszermintákból, folyadékkromatográfiás, tandem tömegspektrometriás méréshez* című diplomadolgozat titkosítását.

Kelt: Budapest, 2025.10.28.

  
a képviselő aláírása  
**Eurofins Food and Feed Testing  
Budapest Kft.**  
1045 Budapest, Anonymus u. 6.  
Adószám: 32434747-2-41  
- 1 -

A titkosítási kérelmet TÁMOGATOM / NEM TÁMOGATOM.

Kelt: 2025.11.03.

  
konzulens aláírása

A titkosítási kérelmet ENGEDÉLYEZEM / NEM ENGEDÉLYEZEM.

Elutasítás esetén indokolás: \_\_\_\_\_

Kelt: 2025.11.03.

  
szakfelelős/szakkoordinátor aláírása

---

### **Záradék**

Az egyetemi Oktatási Bizottság a Tanulmányi és Vizsgaszabályzat 7. számú függelékét képező szakdolgozat/diplomadolgozat titkosítási kérelmet 95. § (6) bekezdése alapján 2020. március 26-i ülésén fogadta el. Határozatszám: 40/2020/21. (III.26.) EOB határozat.

Az egyetemi Oktatási Bizottság a Tanulmányi és Vizsgaszabályzat 7. számú függelékét képező szakdolgozat/diplomadolgozat titkosítási kérelmet 95. § (6) bekezdése alapján 2023. május 3-i ülésén módosította. Határozatszám: 51/2022/23. (V.3.) EOB határozat.

Gödöllő, 2023. május 3.

Dr. Szabó István  
oktatási és nemzetközi rektorhelyettes

## Tartalom

1	Bevezetés és célkitűzések .....	6
2	Irodalmi áttekintés .....	8
2.1	Mikotoxinok szerepe az élelmiszerbiztonságban.....	8
2.2	Patulin tulajdonságai.....	8
2.2.1	Előfordulása .....	8
2.2.2	Kémiai tulajdonságai .....	10
2.2.3	Egészségi kockázatai .....	10
2.3	Patulin meghatározásának analitikai módszerei .....	11
2.3.1	Hagyományos módszerek.....	12
2.3.2	Kromatográfiai technikák.....	12
2.3.3	Mintaelőkészítés.....	14
2.4	Analitikai módszerek validálása .....	17
2.4.1	Követelmények .....	17
2.4.2	Vizsgált paraméterek.....	20
3	Anyagok és módszerek.....	21
4	Eredmények és értékelésük .....	23
4.1	Megfelelő eluens-összetétel és kolonna kiválasztása .....	24
4.1	Tesztmérés mintamátrixokkal.....	29
4.2	Validálás.....	30
4.2.1	Specifikusság.....	30
4.2.2	Alsó méréshatár, jel/zaj arány meghatározása.....	31
4.2.3	Linearitás .....	32
4.2.4	Visszanyerés .....	35
4.2.5	Ismételhetőség .....	36
5	Összefoglalás .....	38
6	Irodalomjegyzék.....	39

# 1 Bevezetés és célkitűzések

Az elmúlt évtizedekben lezajló változások, mint pl. a városiasodás, globalizáció vagy turizmus fellendülése átalakította a fogyasztói elvárásokat, ennek kiszolgálására pedig az élelmiszeripar termékeit nagyobb kínálatban és szélesebb választékban kezdte el árusítani, ami egyre összetettebb és hosszabb élelmiszerláncot eredményezett, és amitől nagyobb lett a kontamináció esélye. Az éghajlatváltozás következtében a levegő és a vizek hőmérséklete emelkedik, a csapadék mennyisége változékony, ezen kívül a szélsőséges időjárási jelenségek is egyre gyakoribbak, amelyek szintén hozzájárulnak az új és meglévő élelmiszer eredetű megbetegedések kockázatának emelkedéséhez (WHO, 2024). Például Európa nagy részén az aflatoxint termelő *Aspergillus* penészgombafajt sokáig csak raktári penészként tartották számon, mára azonban a globális felmelegedés miatt a szántóföldön is megjelenik.

Élelmiszer eredetű megbetegedést okozhatnak fizikai, biológiai és kémiai eredetű szennyezők, utóbbiak közé tartoznak a penészgombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek, ún. mikotoxinok. Bár mára közel 400 féle mikotoxint azonosítottak, ezek közül csak néhány jelent veszélyt az emberre, és ezek közé tartozik a patulin is. Patulin leggyakrabban gyümölcsök felületi sérülései következtében kialakuló gombás fertőzés során termelődik. Bár az IARC 3-as csoportba sorolták, számos akut és krónikus egészségkárosító hatása miatt szabályozva van az élelmiszerekből kimutatható maximális mennyisége. A 2023/915/EK rendelet kimondja, hogy gyümölcslevek és erjesztett italok maximum 50 µg/kg, szilárd termékek (pl. kompót, püré) 25 µg/kg, kisgyermekeknek szánt levek, szilárd termékek és bébiételek maximum 10 µg/kg mennyiségben tartalmazhatják a patulint. Kimutatására többféle módszer alkalmazható, pl. immunoassay (ELISA), valós idejű kvantitatív polimeráz-láncreakció (qPCR) vagy gáz- és folyadékkromatográfia (HPLC-UV, HPLC-MS/MS).

A folyadékkromatográfias mérés esetében a mintaelőkészítésnek nagy szerepe van, hiszen így extraháljuk ki a mérendő komponenszt a mintából és így szabadulunk meg a mérést és kiértékelést zavaró komponensektől. Ezek az előkészítések javarészt oldószeres folyadék-folyadék vagy szilárd-folyadék extrakciót, különböző tisztítási lépéseket, bepárlást és oldószercserét jelentenek, melyek gyakran hosszadalmasak, körülményesek, nagy az eszköz- és anyagigényük. A QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) módszer lényegében egy extrakciós, egy víztelenítési és egy tisztítási lépést tartalmaz, mellyel gyorsabbá és egyszerűbbé válhat a mintaelőkészítési folyamat.

A dolgozat célja egy olyan módszer kidolgozása, mely QuEChERS mintaelőkészítést és HPLC-MS/MS-sel történő mérést alkalmaz patulin kvantitatív meghatározására különböző

élelmiszermátrixokból. Az igény egy másik analitikai eljárásra több okra is visszavezethető. Egyrészt független módszerek megléte mindig hasznos a szelektivitásba és pontosságba vetett bizalom fenntartásához. Másrészt a rutinszerű mérések során igény mutatkozik a hagyományos (szerves oldószeres, oszlop tisztítást alkalmazó) módszerekhez képest egyszerűbb módszer alkalmazására.

A dolgozattal kapcsolatos célokat az alábbiakban határoztam meg:

- A megfelelő eluensek és eluens-összetételek megtalálása.
- A megfelelő mérési módszer kikísérletezése.
- A megfelelő kolonnatípus megtalálása.
- Annak megállapítása, hogy a mérés alkalmas-e patulin kvantitatív mérésére különböző mintamátrixokból.
- A mérés validálásához szükséges mérések és számítások végrehajtása.
- A kapott adatok értékelése olyan szempontból, hogy megfelel-e a jogszabályi követelményeknek.

## 2 Irodalmi áttekintés

### 2.1 Mikotoxinok szerepe az élelmiszerbiztonságban

A fonalas gombák a természetben bárhol előfordulhatnak, mivel nagyon könnyen alkalmazkodnak változatos környezeti körülményekhez (pH, hőmérséklet, páratartalom) (Gal és mtsai., 2024). Előszeretettel jelennek meg a mezőgazdasági terményeken, akár a szántóföldön, akár a betakarítást követő tárolás során (Câmara és mtsai., 2023; Gal és mtsai., 2024; Shinde és mtsai., 2021). Fejlődésük során másodlagos anyagcseretermékeket, ún. mikotoxinokat termelhetnek, melyek kis molekulatömegű vegyületek, és már kis koncentrációban is toxikus hatással bírnak (Malachová és mtsai., 2014). A legfontosabb toxintermelő gombák az *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* és *Fusarium* fajok. Máig közel 400 különböző mikotoxint azonosítottak, de ezek közül csak az aflatoxinok, fumonizinek, zearalenon, ochratoxin A és a patulin jelent veszélyt különböző állatfajokra és az emberre (Gal és mtsai., 2024). Változatos kémiai szerkezetük miatt eltérő toxicitással rendelkeznek, akut és krónikus megbetegedéseket is okozhatnak, valamint más és más szerveket, szervrendszereket támadhatnak meg (Malachová és mtsai., 2014). Ugyanakkor meg kell említenünk, hogy a gomba jelenléte nem feltétlenül jelent toxinszennyezettséget, mivel a toxin termelődéséhez más körülmények szükségesek, mint a gomba fejlődéséhez (Gal és mtsai., 2024).

### 2.2 Patulin tulajdonságai

#### 2.2.1 Előfordulása

A patulin egy mikotoxin, mely gyümölcsök gombás fertőződése során keletkező másodlagos metabolit, és főleg a *Byssochlamys*, az *Aspergillus* és a *Penicillium* nemzetségekbe tartozó fajok termelik (pl. *A. clavatus*, *A. giganteus*, *P. expansum*, *P. patulum*, *P. crustosum*, *B. nivea*) (Gal és mtsai., 2024; Notardonato és mtsai., 2021; Sadok és mtsai., 2019; Vaclavikova és mtsai., 2015). Míg meleg és nedves éghajlaton az *Aspergillus* fajok termelnek patulint, addig a *Penicillium* fajok inkább hidegebb környezetben (Gal és mtsai., 2024). A penészgombák 20-37 °C közötti hőmérséklet tartományban növekednek, a *P. expansum* optimuma 25 °C, a toxintermelés optimuma pedig 25,5 +/- 5,5 °C, de a gomba alacsonyabb hőmérsékleten is túlél (-3 – 10 °C), ahol a toxintermelés megtörténhet, csak lassabban, tehát a hőmérséklet csökkentése csökkenti a patulin koncentrációját (Gal és mtsai., 2024). Patulinnal legfőképpen alma és almatermékek lehetnek szennyezettek, de kimutatták már egyéb gyümölcsökben (pl. cseresznyében, körtében, eperben, magóban, sárgabarackban, szilvában, szőlőben, banánban vagy paradicsomban), zöldségekben, gabonákban és magvakban (Gal és mtsai., 2024; Marsol-

Vall és mtsai., 2014; Sadok és mtsai., 2019; Vaclavikova és mtsai., 2015). A betakarítás, szállítás vagy tárolás során szerzett felületi sérülésekben jelenik meg, innen hatol be a húsba és fejlődik tovább (Notardonato és mtsai., 2021). Ritkább esetben a kocsányon keresztül is behatol a gyümölcs belsejébe, a rothadás a húsban történik meg, miközben a héj ép marad, ezáltal nem észrevehető a szennyezettség a fogyasztó számára (Notardonato és mtsai., 2021). A patulin megjelenése függ a gyümölcs genotípusától, mivel ez meghatározza a sebgyógyulási képességet és a fertőzésekkel szembeni ellenállóságot (Gal és mtsai., 2024). A *Penicillium expansum* a leggyakoribb patulintermelő penész (Vidal és mtsai., 2019), a gyümölcsön eleinte fehér foltok alakulnak ki, majd megjelennek a jellegzetes kékes-zöldes színű konídiumok és a gyümölcs rothadásnak indul (Notardonato és mtsai., 2021; Vaclavikova és mtsai., 2015). Ezek a konídiumok tovább terjedhetnek egyik terményről a másikra szél, víz vagy rovarok által, mely további fertőzést eredményez a szántóföldön. Ez nem csak élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent, de komoly gazdasági kárt is (Gal és mtsai., 2024). A patulin kimutatása a gyümölcsben utal a nyersanyag betakarítás előtti és utáni technológiai gyakorlatok megfelelőségére (Vaclavikova és mtsai., 2015). Betakarítás előtt és alatt a jó mezőgazdasági gyakorlatok (GAP) alkalmazásával csökkenthetjük a gombás megfertőződés esélyét és mikotoxin képződést, így pl. a fák gondos metszése, biológiai védekezőszerekkel és fungicidekkel való kezelés, a gondos betakarítás, a száraz környezetben és alacsony hőmérsékleten való tárolás (Kuptsova és mtsai., 2022; Vaclavikova és mtsai., 2015), de hatékony védekezés továbbá a kalciumban vagy foszforban gazdag trágya használata vagy gombákkal szemben ellenálló növényfajták nemesítése (Babaali és mtsai., 2017). A betakarítást érett gyümölcs esetében 18 órán belül el kell végezni, fontos a környezeti szennyeződések (pl. rovarok) és hulladékok eltávolítása, a szállítás és tárolás tiszta, száraz és hűtött környezetben kell, hogy történjen, valamint alkalmazhatók gombaölő szerek és antioxidánsok is (Babaali és mtsai., 2017). A gyümölcs rothadt részeinek eltávolítása csökkentheti a késztermékben található patulin mennyiségét, de a toxin ugyanúgy megtalálható azokban a szomszédos szöveti részekben, melyek látszólag épek (Gal és mtsai., 2024). A gomba inaktiválása vagy elpusztítása nem eliminálja a patulint a termékben, emellett a különböző feldolgozás- és gyártástechnológiai lépések sem hatékonyak a toxinkoncentráció csökkentésében, mivel kémiaiilag stabil, vízdékony és hőnek ellenálló vegyületről beszélünk (Gal és mtsai., 2024). A különböző gyümölcstermékek (pl. levek, pürék) gyártása során a hőkezelés (pl. pasztörözés, koncentráció) nem csökkenti jelentős mértékben a patulin koncentrációját, mivel az savas közegben rendkívül hőstabil (Kuptsova és mtsai., 2022; Sadok és mtsai., 2023). A *Byssoschlamys* törzsek (*B. fulva* és *B. nivea*) ellenállóak az feldolgozás során alkalmazott hőkezeléssel szemben, így magában a termékben (pl.

gyümölcsle) okozhatnak romlást (Sadok és mtsai., 2019). A hőkezelésnél hatékonyabb a mosás, a szűrés (főleg az ultraszűrés), és az enzimes kezelés, továbbá a leghatékonyabbnak a centrifugálás és az UV besugárzás bizonyult (Babaali és mtsai., 2017; Ioi és mtsai., 2017; Vidal és mtsai., 2019). Mivel az általános gyártástechnológiai lépések nem csökkentik a patulin koncentrációját, a legjobb megoldás, ha a megelőzésre fektetjük a hangsúlyt; a jó mezőgazdasági gyakorlat (GAP) a betakarítás előtt és a jó gyártási gyakorlat (GMP) betartása a feldolgozás során nagyon fontos (Babaali és mtsai., 2017; Kuptsova és mtsai., 2022).

### 2.2.2 Kémiai tulajdonságai

A patulin (UIPAC név: 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]pirán-2(6H)-on, CAS-szám: 149-29-1) egy heterociklikus, telítetlen lakton, moláris tömege 154,12 g/mol, nem illékony, olvadáspontja 110 °C. Vízben, metanolban és etanolban oldódik. Hőálló, 105-125 °C közötti vízben és 3,5-5,5 közötti pH-tartományban meglehetősen stabil, ennél lúgosabb pH-n viszont spontán lebomlik (Notardonato és mtsai., 2021). Az almalében meglehetősen ellenálló a savas közeg és olyan vegyületek jelenléte miatt, mint pl. az almasav, szerin és treonin (Babaali és mtsai., 2017). Erős affinitással rendelkezik szulfhidrilcsoportokhoz (Sadok és mtsai., 2023). A szulfitek elősegítik a lebomlását, így pl. gyümölcsökben a patulin reagál a szulfhidrilcsoportokkal, különösen glutation (GSH) molekulában található -SH csoporttal. A reakció eredményeképpen a patulin inaktívulódik, a glutation koncentráció pedig csökken, ami miatt a sejtek oxidációs redukciós egyensúlya felborul, oxidatív stressz jön létre és a gyümölcs barnulásához és gyorsabb romlásához vezet (Notardonato és mtsai., 2021).

### 2.2.3 Egészségi kockázatai

A patulin élőlényekre toxikus hatású vegyület, ugyanakkor antimikrobiális tulajdonságai miatt korábban antibiotikumként használták (Sadok és mtsai., 2023). A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC) által összeállított veszélyességi kategóriák közül a harmadik csoportba sorolták, mivel nem áll rendelkezésre elegendő bizonyíték állatkísérletekből és epidemiológiai vizsgálatokból a karcinogén hatás bizonyítására (Sadok és mtsai., 2023). Ugyanakkor egereken végzett állatkísérletekkel már kimutatták rákkeltő hatását és a WHO is genotoxikus vegyületként tartja számon (Kuptsova és mtsai., 2022; Notardonato és mtsai., 2021). Az LD50 egerek esetében 25-55 mg/kg, baromfik esetében 170 mg/kg (Kuptsova és mtsai., 2022). Az akut patulin mérgezés gyomor-bélrendszeri problémákat okoz, mint pl. hányingert, hányást, a belekben fekélyeket, belső vérzéseket, károsítja a szerveket (pl. a májat, a veséket, az agyat) valamint a bélbarriert és a bélflóra összetételét (Kuptsova és mtsai., 2022; Notardonato és

mtsai., 2021; Sadok és mtsai., 2019; Vidal és mtsai., 2019). További tünetek lehetnek görcsök, tüdővizenyő, nyugtalanság, légszomj, ödéma, puffadás, hiperémia, veseelégtelenség (Babaali és mtsai., 2017; Gal és mtsai., 2024). A krónikus expozíció hepatotoxikus, kardiotoxikus, neurotoxikus, immunotoxikus, genotoxikus, teratogén és karcinogén hatású (Notardonato és mtsai., 2021; Sadok és mtsai., 2023; Vidal és mtsai., 2019). A patulin oxidatív károsodást okoz a DNS-ben, mely a bázisszekvenciák véletlenszerű módosulásához (mutagenézis) és rák (pl. nyelöcső-, bélrák) kialakulásához vezet (Câmara és mtsai., 2023; Vidal és mtsai., 2019). A patulin elsősorban a plazmamembránra fejt ki toxikus hatást, illetve gátló hatással van számos enzimre (ATPáz, lizoszomális enzimek, RNS-polimeráz, stb.) a szulfhidril csoportokhoz való affinitása miatt (Babaali és mtsai., 2017; Notardonato és mtsai., 2021; Vidal és mtsai., 2019). A toxicitás molekuláris mechanizmusával kapcsolatos kutatások főleg a patulin magas reaktivitását emelik ki nukleofil molekulákkal, így a fehérjék szulfhidrilcsoportjaival és a glutationnal, az azt követő DNS károsodást, vagy a fehérjeexpresszió szabályozási zavarát (Sadok és mtsai., 2019). Különböző mikotoxinok együttes előfordulása fokozhatja egymás toxikus hatását, így patulin esetében már kis koncentráció is káros lehet, ha pl. szterigmatocisztin vagy beauvericin társul mellé (Sadok és mtsai., 2019). Az italokból származó patulin toxikusabb, mint a szilárd ételekből bevitt, mivel utóbbiak lassítják a felszívódását (Babaali és mtsai., 2017). A felszívódásra vonatkozóan kevés információ áll rendelkezésre, az in vitro megfigyelések alapján a biológiai hozzáférhetőség magasnak mondható, különösen orális úton (87%) és a gyomorban (82%), következésképpen nagy része felszívódik (Vidal és mtsai., 2019). A patulin kisgyermek számára különösen veszélyes a felnőttekhez képest alacsonyabb testsúly és fiziológiai különbségek miatt, épp ezért a csecsemőknek szánt termékekben ötször kevesebb a megengedett koncentráció, mint pl. az almalében (Gal és mtsai., 2024).

### 2.3 Patulin meghatározásának analitikai módszerei

A fogyasztók biztonsága és egészsége érdekében szükségessé vált egy érzékeny, szelektív és megbízható analitikai módszer alkalmazása patulin meghatározására. Számos analitikai módszer került kidolgozásra patulin mennyiségi meghatározására (főleg almatermékekben), így pl. vékonyréteg kromatográfia, gázkromatográfia-tömegspektrometria, vagy folyadékkromatográfia különböző detektálási módszerekkel (UV-abszorpció, tömegspektrometria). Az elmúlt évek tapasztalatai azonban azt mutatják, hogy a patulin szennyeződések mérésekor nem korlátozódhatunk csak alma alapú termékekre, hanem más gyümölcsöket (pl. erősen pigmentált gyümölcsök) és belőlük készült komplex

élelmiszermátrixokat (lekvárok, szárítmányok) is vizsgálni kell, melyek kihívást jelentenek az analitikusoknak a mennyiségi elemzés tekintetében a mátrixból adódó alacsony érzékenység miatt.

### 2.3.1 Hagyományos módszerek

Az immunoassay (immunpróba) vizsgálatok, mint pl. az ELISA vagy LFIA gyors és megbízható mérési módszerek, ezért kedveltek az élelmiszeriparban. A kromatográfias technikákhoz képest egyszerűbb, gyorsabb, költséghatékonyabb, ezen kívül számos minta egyidejűleg mérhető és nem igényel nagy mintamennyiséget. Az ELISA módszerek alapja az antigén-antitest reakció, mely során az antigén és a hozzá specifikus antitest kötődése enzim hozzáadása után, általában színváltozás kíséretében kimutatható és spektrofotometriás méréssel az eredmény számszerűsíthető. Hátránya az, hogy a szinte azonos kémiai szerkezetű vegyületek nem a megfelelő antitestekhez kötődhetnek, és így koncentrációt alá- vagy túlbecsüljük (Gal és mtsai., 2024).

A bioszenzorok szintén alkalmasak toxinok kimutatására különböző élelmiszer mátrixokból. A bioszenzorok olyan mérőeszközök, melyeknél biológiai anyagok (pl. enzimek, DNS, antitestek) lépnek reakcióba az analittal, ezt a biológiai reakciót pedig egy átalakító elektromos jellé alakítja (Gal és mtsai., 2024).

Hagyományos módszerek közé tartozik még a valós idejű kvantitatív polimeráz-lánreakció (qPCR), mely egy DNS alapú technika. A PCR készülékben a vizsgálni kívánt DNS-t ciklusokon keresztül amplifikálják, a reakcióban fluoreszcens festéket alkalmazunk, amelynek intenzitása a DNS mennyiségével arányosan változik és ezt mérjük. Előnye, hogy nagyon érzékeny és specifikus technika, hátránya, hogy szakértői elemzést igényel és a fals pozitív vagy negatív eredményeket csak primerekkel lehet megkülönböztetni (Gal és mtsai., 2024).

### 2.3.2 Kromatográfias technikák

A patulin toxicitása és az élelmiszerekre vonatkozó határértékek miatt szükség van olyan mérési módszerekre, melyek alacsony kimutatási és kvalifikálási határral rendelkeznek (Sadok és mtsai., 2023). Az elmúlt évtizedben a kutatók számos kromatográfias technikát fejlesztettek ki a patulin kimutatására, így pl. gázkromatográfia (GC), folyadékkromatográfia (HPLC) diódasoros (DAD), vagy ultraibolya (UV) detektálással (Shinde és mtsai., 2021; Vaclavikova és mtsai., 2015). A patulin elemzésében a GC-s módszerek nem elterjedtek, mivel a mikotoxinok nem illékonyak, ezért a mintaelőkészítés során származékképzést kell alkalmazni. Cunha és munkatársai (Cunha és mtsai., 2009) egy megbízható GC-MS módszert

validáltak patulin mennyiségi meghatározására almában és birsalmában, valamint almatermékekben (almalé, almalekvár, cider, bébiétel, birslekvár). A homogenizált mintát etil-acetát és hexán elegyével extrahálták, majd az extraktumot N,O-bis-trimetilszilil-trifluoracetamid (BSTFA) és 1% trimetilklor-szilán (TMCS) segítségével származékolták. A veszteségek és mátrixhatások kompenzálására <sup>13</sup>C-izotópjelzett patulint használtak belső standardként. A módszer LOD és LOQ értékei 0,4 és 1,6 µg/kg alma esetében. A 8-50 µg/kg közötti szinteken adalékolt minták visszanyerési arányai alma esetében 71-89% lett. A mérések ismételtetősége (relatív szórásaként, RSD) kisebb, mint 16%.

Legnépszerűbb módszer a folyadékkromatográfia (HPLC) (Gal és mtsai., 2024), mely esetében a mintaelőkészítési módszerek alapelve ugyanaz; etil-acetáttal végzett extrakcióra épül, amelyet nátrium-karbonátos tisztítás követ, majd fordított fázisú HPLC-n választják el 276 nm-en UV-val detektálják (Desmarchelier és mtsai., 2011). A patulin analízisben problémát jelent az extraktum tisztítása és a műszeres detektálás érzékenysége, ezért mintaelőkészítés során fontos az UV/VIS abszorbeáló, zavaró mátrixkomponensek eltávolítása (Vaclavikova és mtsai., 2015). Hátránya, hogy körülményes, a nátrium-karbonátos tisztítás megnöveli az extraktum pH-értékét (ahol instabil a patulin, és emiatt a visszanyerés csökkenhet), valamint az UV-detektálásnak gyenge a szelektivitása, ami miatt az alapvetően is bonyolult mintaelőkészítésben sok esetben SPE oszlopos tisztítást is alkalmaznak (Desmarchelier és mtsai., 2011). A HPLC-UV módszereknél problémát okoz, hogy a patulin és a fenolos vegyületek, valamint az 5-hidroxi-metil-furfural (5-HMF) UV elnyelése nagy és hasonló a retenciós idejük számos kromatográfiai körülmény között, ezért hajlamosak átfedő csúcsokat képezni (Desmarchelier és mtsai., 2011; Notardonato és mtsai., 2021). Gaspar és Lucena (Gaspar & Lucena, 2009) egy HPLC-DAD módszer fejlesztettek ki patulin és furfuralok (5-HMF, 5-MF, 2-F) egyidejű meghatározására különböző élelmiszer-mátrixokban (penészes alma, almalé, méz, cukrok, karamell, balzsamecet, táplálékkiegészítők). Az elválasztáshoz C18-as oszlopot használtak. A módszer alacsony kimutatási és kvantifikálási határral dolgozik (patulinnál ez 0,09 és 0,26 µg/L, míg 5-HMF-nél 0,06 és 0,19 µg/L), visszanyerés almalé esetében patulinra 91-94%, furfuraloknál az erős mátrixhatás miatt 6-109%, az RSD pedig 6-15%. A patulin és a furfuralok legmegfelelőbb elválasztását a savanyított (pH ~ 3) mobil fázissal, gradiens elúcióval és a 15 °C-os kolonnahőmérséklettel érték el.

A kutatók arra a meghatározásra jutottak, hogy az UV vagy DAD alapú módszerek érzékenysége gyenge és szelektivitása korlátozott, különösen alacsony koncentrációk esetén (Shinde és mtsai., 2021). Hatékonyabb technika, ha a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfhoz vagy gázkromatográfhoz tömegspektrométert kapcsolunk

detektorként (HPLC-MS/MS vagy GC-MS), mellyel jobb érzékenységet és specifikusságot érhetünk el, emellett kisebb az oldószerfogyasztása (Shinde és mtsai., 2021). Bár a multi-mikotoxin módszerek esetén az LC-MS/MS kiváló érzékenységet és szelektivitást biztosít különböző mintamátrixokban, a patulin általában nem szerepel a célkomponensek között, vagy csak a szabályozási szinteknél magasabb koncentrációban mérhető, így pl. a csecsemőtápszerekre vonatkozó jogszabályi határértéknek megfelelő koncentrációk nem mérhetők (Sadok és mtsai., 2023), illetve ezek a módszerek általában gabonafélékre vagy olajos magvakra vannak validálva, amely mátrixok esetében ritka a patulin előfordulása (Vaclavikova és mtsai., 2015). A patulin mérése speciális LC-MS/MS feltételeket igényel, ami alacsony visszanyeréshez és alacsony érzékenységgű méréshez vezet. Nagy probléma a patulin gyenge ionizációja mind elektropray (ESI), mint atmoszférikus nyomású kémiai ionizációs (APCI) körülmények között, ami alacsony érzékenységet eredményez. Detektálása pozitív elektropray ionizációs módban (ESI+) méginkább kihívást jelent (Sadok és mtsai., 2023). A mátrixhatások miatt jelentős ionelnyomás figyelhető meg, valamint erősen befolyásolják az LC-MS/MS módszerek pontosságát, precizitását és kimutatási határát (Sadok és mtsai., 2023). További probléma, hogy a patulin magas polaritása miatt retenciós ideje nagyon alacsony, így a fordított fázisú LC rendszerből egyidejűleg eluálódik a többi poláros mátrixkomponenssel, ami jelentős jelszupressziót eredményez (Vaclavikova és mtsai., 2015).

### 2.3.3 Mintaelőkészítés

#### 2.3.3.1 Hagyományos módszerek

A gyümölcsök magas cukortartalommal rendelkeznek (szacharóz, glükóz, fruktóz, xilóz), gazdagok szerves savakban (citromsav, fumársav, borkősav), valamint flavonoidokat és egyéb polifenol jellegű alkotókat tartalmaznak (főleg a bogyós gyümölcsök), zsír- és fehérjetartalmuk viszont általában alacsony (Sadok és mtsai., 2019). A gyümölcs- és zöldségmátrixok komplexitása nagyban befolyásolja a patulin analitikai meghatározását, pl. zavarja az elválasztást, csökkenti a visszanyerést és MS detektálás esetén az ionizáció hatékonyságát (Sadok és mtsai., 2019). Ezen interferenciák csökkentésére különböző mintaelőkészítési módszerek állnak rendelkezésre. Bár folyékony mátrixok esetében elterjedt a módszer az etil-acetáttal végzett folyadék-folyadék extrakció (LLE), hátránya, hogy időigényes, nagy a szerves oldószer igénye, és jelentős a mátrixhatás (gyakoriak a zavaró komponensek a kromatográfias elemzés során, pl. magas pigmenttartalom miatt) különösen többszöri extrakció esetén (Sadok és mtsai., 2019). A pigmenttartalom extrakciója függ a pigment típusától, a gyümölcs pH-jától (minél alacsonyabb, annál jobb) és az oldószertől; Sadok és munkatársai (2019) különböző

pigmenttartalmú gyümölcsök extrakciójával kísérleteztek, és azt találták, hogy a karotionoidok (pl. sárgabarack, mangó, grapefruit) könnyebben oldódnak etil-acetátban, míg az antocianinok (pl. szeder, ribizli, kékszőlő) inkább acetonitrilben (utóbbi a QuEChERS mintaelőkészítés általános oldószere). A gyümölcsök elsődleges sejtfala főként pektinből áll, melyet az élelmiszeripar zselésítőanyagként, sűrítőanyagként és stabilizátorként használ fel (Notardonato és mtsai., 2021). Szüretlen levek és szilárd almatermékek esetén gyakori lépés a pektin kromatográfiás analízis előtti enzimátikus hidrolízise, mely javítja a minta tisztaságát és patulin visszanyerését, mivel felszakítja a toxin és a gyümölcsrostokban lévő fehérjék között fennálló kötéseket (Notardonato és mtsai., 2021; Sadok és mtsai., 2019). A hidrolízis pektináz enzim és esetekben amiláz enzim segítségével valósul meg (Notardonato és mtsai., 2021; Sadok és mtsai., 2019). Az Association of Official Analytical Chemists (AOAC) hivatalos módszere almálé esetében a patulin kinyerésére etil-acetátos folyadék-folyadék extrakciót, majd nátrium-karbonátos tisztítást és HPLC-UV-s detektálást ajánl. Mivel a patulin lúgos környezetben nem stabil, a nátrium-karbonát miatti pH emelkedés elkerülése érdekében nátrium-szulfát vagy nátrium-hidrogén-karbonát is szolgálhat alternatívaként (Notardonato és mtsai., 2021; Sadok és mtsai., 2019). A folyadék-folyadék extrakció (LLE) hátránya a nagy oldószermennyiség és a hosszú mintaelőkészítési idő (Notardonato és mtsai., 2021). A hagyományos LLE helyett jó alternatíva az ultrahangos technika, ami hatékonyan segíti az extrakciót a nem elegyedő, mintából származó vizes fázis és a szerves oldószerek között, több minta egyidejű extrahálását teszi lehetővé kevesebb minta- és oldószermennyiség mellett (Sadok és mtsai., 2019). A szilárd fázisú extrakció (SPE) alkalmazása lehetővé teszi a célmolekula izolálását, koncentrációját vagy tisztítását (Notardonato és mtsai., 2021). A (folyékony) mintát önmagában vagy oldószeres extrakciót követően az SPE oszlopra juttatjuk, ahol a mintában lévő komponensek a szilárd fázishoz való affinitásuk alapján elválasztódnak (Notardonato és mtsai., 2021). Mivel a patulin savas pH-n stabil, érdemes a mintaelőkészítési folyamat egyes lépéseiben a pH-t ennek megfelelően ellenőrizni és beállítani, így pl. az extrahálásnál és a tisztítási lépés után (Notardonato és mtsai., 2021). Sadok és munkatársai (2018) kimutatták, hogy 1% v/v ecetsavat tartalmazó acetonitrillel történő extrahálás epermintáknál jobb visszanyerést eredményezett, mint tiszta acetonitril esetében. Ugyanerre a következtetésre jutottak Valle-Algarra és munkatársai (Valle-Algarra és mtsai., 2009) almatermékek esetében, mikor  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -ot adtak etil-acetát-hexán 94:6 v/v elegyéhez. Ennek a magyarázata az, hogy a savanyított oldat megbontja a toxin és más komponensek (pl. fehérjék és cukrok) közötti kölcsönhatásokat, ugyanakkor az alacsonyabb pH-val rendelkező minták extraktumaiban több zavaró komponens is átkerül (Sadok és mtsai., 2019). A pH a tisztítási lépésekben is megnőhet, pl. QuEChERS

esetén PSA tisztítás során vagy LLE esetén  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  használat esetén, ebben az esetben a pH-t jégecettel 4-re állítják be. Ezen kívül a mobil fázis ecetsavas savanyítása is gyakori. Egyes módszerek az extrahálás és tisztítás után a szerves fázist elpárologtatják.

### 2.3.3.2 *QuEChERS*

A QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) mintaelőkészítési módszer egyik gyakran használt „standard” verziója során 10 g homogenizált mintát 10 ml acetonitrillel extrahálunk, majd egy sókeveréket adunk hozzá (4 g vízmentes magnézium-szulfát és 1 g nátrium-klorid), ezt követően 1 ml-t tovább tisztítunk diszperzív szilárd fázisú extrakcióval (dSPE) 150 mg vízmentes magnézium-szulfát és 25 mg PSA (Primary secondary amine) szorbens segítségével. A PSA szorbens a poláros mátrixkomponenseket, így pl. szerves savakat, pigmenteket és cukrokat, a szénalapú szorbens (GCB, Graphitized Carbon Black) karotinoidokat, klorofillt és szterolokat, a C18 pedig a zsírokat és viaszokat távolítja el hatékonyan. A dSPE előnye a hagyományos SPE-hez képest, hogy nincs szükség kondicionálásra vagy eluálásra és nem igényel további eszközöket, mint pl. a vákuumpumpa, SPE kád, stb. Az eredeti módszert azóta sokféleképpen módosították, optimalizálták. Acetonitril helyett metanol (Vaclavikova és mtsai., 2015), víz és acetonitril keveréke (Desmarchelier és mtsai., 2011), vagy ecetsavval savanyított acetonitril (Sadok és mtsai., 2018) is használható a patulin extrakciójához. A magnézium-szulfát és nátrium-klorid mellé adott pufferek (pl. nátrium-citrát) jobb tisztítást, pH szabályozást és visszanyerést eredményeznek (Marsol-Vall és mtsai., 2014; Sadok és mtsai., 2019). A QuEChERS módszer egyik hátránya, hogy több lépéses módszer révén megnő a veszteség, mely kompenzálására belső standard-et adagolhatunk a mintaelőkészítés elején. Marsol-Vall és munkatársai UHPLC-PDA módszert fejlesztettek módosított QuEChERS mintaelőkészítéssel, mely esetben nátrium-citrát hozzáadásával javították a tisztítás hatékonyságán. A következő mátrixokkal dolgoztak: szüretlen almale, almapüré, almás joghurt, almás sör és cider. A eluensnek 0,1% ecetsavat tartalmazó vizet, B eluensnek 0,1% ecetsavat tartalmazó acetonitrilt használtak, és C18-as kolonná LOD  $\leq 0,4$  ng/g és LOQ és  $\leq 2$  ng/g, a visszanyerések 78,4 és 94,7% közöttiek, RSD-k 3,8 és 10,4 %.

## 2.4 Analitikai módszerek validálása

A validálás célja zöldség- és gyümölcsstermékek patulin tartalmának meghatározására használt QuEChERS mintaelőkészítési és HPLC-MS/MS mérési módszer megfelelőségének igazolása.

### 2.4.1 Követelmények

Az élelmiszerekben előforduló szennyező anyagok megengedett legmagasabb szintjét a 2023/915-ös Európai Uniói rendelet rögzíti. A patulinra vonatkozó határértékeket különböző mintamatrixokra a következő táblázat foglalja magában (1.táblázat).

#### 1.táblázat: A patulinra vonatkozó határértékek

Forrás: Európai Unió 2023/915 rendelete (2023)

Mintamatrix	Felső határérték ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Megjegyzések
Gyümölcslevek, sűrítmenyből készült, ill. sűrített gyümölcslevek, gyümölcsnektárok	50	A sűrített gyümöslé esetében a felső határérték az elkészített gyümöslére vonatkozik.
Szeszes italok, almabor, almából készült vagy almalevet tartalmazó egyéb erjesztett italok	50	
Szilárd almatermékek (végső fogyasztásra szánt)	25	Ide tartozik az almakompót és almapüré is.
Csecsemők és kisgyermekek számára készített almalé és szilárd almából készült termékek	10	Ide tartozik az almakompót és almapüré is. A felső határérték a fogyasztásra kész vagy a gyártó utasításai szerint elkészített termékekre vonatkozik.
Bébiételek	10	A felső határérték a fogyasztásra kész vagy a gyártó utasításai szerint elkészített termékekre vonatkozik.

Az Európai Unió 401/2006/EK rendelete az élelmiszerek mikotoxintartalmának hatósági ellenőrzéséhez használandó mintavételi és elemzési módszerek megállapítását írja le. Általános követelményként meghatározza, hogy az élelmiszerek ellenőrzésére használt analitikai módszereknek a 882/2004/EK rendelet III. mellékletének 1. és 2. tételben foglalt rendelkezéseknek kell megfelelniük. Ezek a rendelkezések a következők:

1. Az analitikai módszereket a következő kritériumok alapján kell jellemezni:
  - a) pontosság
  - b) alkalmazhatóság (közeg és koncentrációtartomány)
  - c) kimutatási határ
  - d) meghatározási határ
  - e) precizitás
  - f) ismételhetőség
  - g) reprodukálhatóság
  - h) visszanyerés
  - i) szelektivitás
  - j) érzékenység
  - k) linearitás
  - l) mérési bizonytalanság
  - m) egyéb választható kritériumok
2. A precizitási értékeket nemzetközileg elismert vizsgálati tervekkel összhangban végzett körvizsgálattal vagy a teljesítménykritériumok teljesülését vizsgáló tesztek alapján állapítják meg. A körvizsgálat eredményeit szabadon hozzáférhetővé kell tenni. Az ismételhetőségi és reprodukálhatósági értékeket nemzetközileg elismert formában kell kifejezni.

A rendelet leírja, hogy az élelmiszerek mikotoxintartalmának meghatározásához nincs konkrét módszer előírva, bármilyen módszer választható, ha az megfelel a feltüntetett alkalmassági kritériumoknak, melyek patulin esetében a következők (2.táblázat):

## 2.táblázat: A patulintartalom meghatározási módszer kritériumai

Forrás: Európai Unió 401/2006/EK rendelete

Mennyiség (µg/kg)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Visszanyerés (%)
< 20	≤ 30	≤ 40	50-120
20-50	≤ 20	≤ 30	70-105
> 50	≤ 15	≤ 25	75-105

ahol:

**r** **Megismételhetőség (ismételhetőségi határ):** az az érték, amelynél a megismételhetőségi körülmények között (ugyanazon minta, kezelőszemély, berendezés és laboratórium, valamint a két vizsgálat között rövid eltelt idő) végzett két külön vizsgálati eredmény közötti abszolút különbség várhatóan kisebb lesz (jellemzően 95%-os valószínűséggel, így  $r = 2,8 \times s_r$ )

**s<sub>r</sub>** **Szórás:** a megismételhetőségi körülmények között kapott eredményekből kell számítani.

**RSD<sub>r</sub>** **Relatív szórás:** a megismételhetőségi körülmények között kapott eredményekből kell számítani:

$$\left(\frac{s_r}{\bar{x}}\right) \times 100$$

**R** **Reprodukálhatóság:** az az érték, amelynél a reprodukálhatósági körülmények között (különböző laboratóriumokban dolgozó kezelőszemélyek által azonos anyagon, standard vizsgálati módszerrel) végzett két külön vizsgálati eredmény közötti abszolút különbség várhatóan kisebb lesz (jellemzően 95%-os valószínűséggel, így  $R = 2,8 \times s_R$ )

**s<sub>R</sub>** **Szórás:** a reprodukálhatósági körülmények között kapott eredményekből kell számítani.

**RSD<sub>R</sub>** **Relatív szórás:** a reprodukálhatósági körülmények között kapott eredményekből kell kiszámítani:

$$\left(\frac{s_R}{\bar{x}}\right) \times 100$$

## 2.4.2 Vizsgált paraméterek

### 2.4.2.1 *Specifikusság*

A cél annak az igazolása, hogy a mintaelőkészítéshez és méréshez használt eszközök és vegyszerek egyike sem tartalmaz olyan szennyezést, ami az analittal egy retenciós időben jön le és így a minták kiértékelését zavarja. Az ellenőrzéshez módszervakot és alsó mérési határon adalékolt mintát mérünk (az analit specifikus MRM átmenetein), majd összehasonlítjuk a kromatogramokat.

### 2.4.2.2 *Alsó méréshatár, jel/zaj arány*

A cél annak igazolása, hogy a tervezett alsó méréshatáron az analit csúcsa megfelelően kiemelkedik a zajból, vagyis a jel/zaj arány megfelelő. Ehhez az alsó méréshatáron adalékolt minta csúcsmagasságát el kell osztanunk a zajszinttel, ami akkor fogadható el, ha nagyobb, mint 10.

### 2.4.2.3 *Linearitás*

A cél annak az igazolása, hogy az adott mérőműszereken keletkező jel és az azt kiváltó mérendő komponens koncentrációja között lineáris függvénykapcsolat áll fenn. Ehhez standard oldatból kalibrációs sort hígítunk, mérjük és a kromatogramokat kiintegrájuk, a koncentrációk függvényében ábrázoljuk a területeket, majd egyenest illesztünk a kapott pontokra és megadjuk a determinációs együtthatót ( $R^2$ ).

### 2.4.2.4 *Visszanyerés*

A visszanyerés számításához a mért koncentrációkat hasonlítjuk a névleges koncentrációkkal. Ennek meghatározására a patulin mentes mintákat 5 párhuzamosban készítjük elő, majd megközelítőleg 5 és 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  szinten adalékoljuk (a tervezett alsó méréshatáron és annak négyszeresén). Az elvárt visszanyerés (kisebb, mint 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  koncentráció esetében) minimum 50%, maximum 120%.

### 2.4.2.5 *Ismételhetőség*

Az ismételhetőséget azonos módszerrel, egy adott laboratóriumban, ugyanazon analitikus, ugyanazon a készüléken kapott mérési eredményeinek összehasonlításával vizsgáljuk. A megközelítőleg 5 és 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  szinten adalékolt, 5-5 db párhuzamos eredményből relatív szórást számolunk ( $\text{RSD}_r\%$ ), melyből következtethetünk az ismételhetőségre. Az Európai Unió 401/2006/EK rendelete szerint patulin esetében 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  alatti szinten az elvárt relatív szórás ( $\text{RSD}_r$ )  $\leq 30\%$ .

### 3 Anyagok és módszerek

A mintaelőkészítés során felhasznált anyagok: 4000 mg  $\text{MgSO}_4$  és 1000 mg  $\text{NaCl}$ -ot tartalmazó QuEChERS sókeverékes tasakok (United Chemical Technologies), illetve 150 mg  $\text{MgSO}_4$ , 50 mg PSA, 50 mg C18 és 7,5 mg GCB tartalmú 2 ml-es QuEChERS dSPE centrifugacsövek (United Chemical Technologies). A mintaelőkészítéshez, illetve az elúcióhoz felhasznált vegyszerek a következők voltak: patulin szilárd standard (Sigma-Aldrich), acetonitril (PanReac AppliChem), LC-MS minőségű metanol (PanReac AppliChem), víz (Merck Milli-Q víztisztító rendszerből, 0,22  $\mu\text{m}$ -es szűrőn szűrt), 100%-os jégcet (Merck, Supelco). A vizsgált mintamátrixok a következők voltak: 100%-os szűrt és szűretlen almalé, almavelő, almaalapú bébiétel, birslekvár, szárított almadarabok, sűrített paradicsom, almás pite, gesztenyepüré. A mintaelőkészítés során felhasznált eszközök: centrifugacső, táramérleg (Mettler Toledo), diszpenzer, automata pipetta (Brand), folyadékfecskendő (Hamilton), vortex (Scientific Industries), centrifuga (Hermle), autosampler vial, fecskendőszűrő.

A kromatográfiához alkalmazott berendezések egy Agilent 1200 HPLC és egy 6410-es hármas kvadrupól tömegspektrométer ESI ionforrással, A felhasznált kolonnák egy Avantor ACE Excel fenilezett C18, 150 x 4,6 mm-es, és egy HALO 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm-es. A műszerek irányítására és az adatok kiértékelésére az Agilent MassHunter Workstation 10.1 szoftvert alkalmaztam.

A mintaelőkészítéshez igyekeztem az utóbbi évek tapasztalatai alapján minél többféle mintatípust összeválogatni. A mérésekhez a következő mintákat használtam: 100%-os szűrt almalé, gesztenyepüré, szárított alma, paradicsompüré, almás-banános bébiétel, almás pite. A mintákat szupermarketből, illetve gyorsétteremből szereztem be. A darabos mintákat Retsch Grindomix GM 200-as késes darálón homogenizáltam. A minták előkészítéséhez a homogenizált mintából bemértem 10 g-ot (száraz, illetve feltételezhetően nagy mátrixhatást okozó mintákból csak 5 g-ot) egy 50 ml-es centrifugacsőbe. A szárazabb mintákhoz (gesztenyepüré, szárított alma, almás pite) annyi Type I. vizet adtam (+ 5-10 ml), hogy az extrakció megfelelő legyen. Készítettem elő addicionált mintákat is, amelyek elkészítését az alábbi táblázat foglalja magában (3. táblázat). Az addicionáláshoz használnom kellett egy töményebb és egy hígabb, 19,6  $\mu\text{g/ml}$ -es és 196  $\text{ng/ml}$ -es patulin standard oldatot is, mivel egyes szintek eléréséhez a hígabból nagyon nagy térfogatot kellett volna használni.

**3.táblázat:** A mintákra vonatkozó addíciós szintek és oldattérfogatok

Minta	Bemérés [g]	Spike szint [µg/kg]		Addicionálás [µl]	
		I.	II.	196 ng/ml mo.	19,6 µg/ml mo.
almalé	10	5	50	250	25
gesztenyepüré	5	5	50	125	12,5
szárított alma	5	10		250	-
paradicsompüré	10	10		500	-
bébiétel	10	10		500	-
almás pite	5	10		250	-

A mintákhoz hozzáadtam 10 ml 0,1% ecetsavat tartalmazó acetonitrilt mérőhenger segítségével, majd ezt követően a 4000 mg MgSO<sub>4</sub>-ot és 1000 mg NaCl-ot tartalmazó keveréket. Összeráztam körülbelül 1 percig, majd 5 perc alatt lecentrifugáltam 4500 rpm fordulatszámon. A tisztájából 1 ml-t átpipettáztam a 150 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg PSA, 50 mg C18 és 7,5 mg GCB tartalmú 2 ml-es dSPE centrifugacsőbe. 30 mp-ig vortexeltem, majd ultracentrifugáltam 13000 rpm-es fordulatszámon. A tisztájából 200 µl-t szűkítőt tartalmazó autosampler fiolába adagoltam.

A kalibrációs pontok egy 196 ng/ml-es munkaoldat és 0,1% ecetsavas acetonitril felhasználásával készültek el, hogy illeszkedjen a minták összetételéhez, elkészítését pedig az alábbi, táblázat foglalja magában (4. táblázat). A kalibráció megtervezésénél szempont volt, hogy a tervezett kvantifikálási határ, (LOQ=5 µg/kg) alatt legyen két ponttal, illetve javasolt két, nagyobb koncentrációjú ponttal (kb. 50 és 100 ng/ml) kiegészíteni a sort, hogy az 50 µg/kg-os határérték körüli értékek is beleessenek a kalibrációs egyenesbe.

**4. táblázat:** A kalibráció összeállítása

Szint	Konc. [ng/ml]	Bemérés [µl]		
		39,2 ng/ml mo.	196 ng/ml mo.	0,1% ecetsav/ACN
k1	1,23	25		975
k2	2,45	50		950
k3	4,90	100		900
k4	9,80	200		800
k5	19,60	500		500
k6	49,00		250	750
k7	98,00		500	500

## 4 Eredmények és értékelésük

A patulin kromatográfiás meghatározására QuEChERS mintaelőkészítéssel és HPLC-MS/MS meghatározással előzetesen már történtek próbálkozások a diplomamunkám készítésének helyszínéül szolgáló laborban is, melynek alapja egy, a United Chemical Technologies által megírt módszer (United Chemical Technologies, 2023). A leírásban egy almaalapú bébiételt készítenek elő QuEChERS-szel, majd a mintát egy 40 °C-ra melegített UCT Selectra DA, 50 × 2.1 mm, 1.8 µm kolonnán választják el 400 µl/perces áramlással egy Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC-n, és egy Thermo Scientific TSQ Vantage MS/MS tömegspektrométerrel analizálják. Az „A” eluens víz, a „B” eluens metanol, a gradiens pedig a következőképpen alakul: 0 perc: 5% B, 0-2 perc: 95% B, 2-3,5 perc: 95% B, 3,5-3,6 perc: 5% B, 3,6-6 perc: 5% B, az injektált térfogat pedig 5 µl. A tömegspektrométerben az ionok ESI-vel (Electrospray ionization) képződnek, és negatív ion módban működtetik. A patulin méréséhez választott m/z értékek a következők: a prekursor ioné 153,0, a termékionoké 109,0 és 81,0 Da mely ionok retenciós ideje 2,32 perc. A módszer során a 10 µg/kg szinten spike-olt minták visszanyerése 99,2-106,1% közötti, szórása 2,35%, míg az 50 µg/kg szinten adalékolt minták visszanyerése 83,4-90,1% között alakult 0,30 % szórással.

A saját munkámnál tehát ebből a módszerből indultam ki, melyet később a tapasztalatok és az irodalmi források alapján módosítottam. Egyrészt létrehoztam egy injektorprogramot, mellyel képesek vagyunk úgy beinjektálni 15 µl-t a mintából, hogy a 100% szerves oldószerben lévő analit megfelelően eluálódjon, másrészt a gradienst a következőképpen módosítottam: 0 perc: 30% B, 0-1 perc: 30% B, 1-8 perc: 95% B, 8-8,1 perc: 95%, illetve beiktattam plusz 4 perc oszlopmosást az első összetétellel. A módszerben leírt MS beállításokkal történt próbálkozások során azt figyeltük meg, hogy a mérésünk érzékenysége nem megfelelő, ezért igyekeztük a mi műszerünkre optimalizálni a mérési beállításokat. Az Agilent MassHunter Acquisition Method Editor szoftverben a QQQ beállítások alatt az MS2 Scan opcióval lehetőség van arra, hogy a program kiválassza nekünk a legmegfelelőbb termékiont. Meg kell adnunk egy fix prekursor iont, melyet a Q1 átenged, és azt az m/z tartományt, amelyben szeretnénk, hogy a Q3 pásztázzon. A végén egy termékion spektrumot fogunk kapni, amely kvalitatív azonosításra szolgál, vagyis megmutatja, hogy mely fragmentumok a legintenzívebbek, melyeket később MRM átmenetként használhatunk. Ha már tudjuk, mely fragmentumok lehetnek fontosak, az MS2 SIN (Selected Ion Monitoring) módszer segít optimalizálni az átmenetek kiválasztását úgy, hogy egyszerre több, kisebb termékion

tömegtartományt monitorozhatunk vele. Gyorsabb és érzékenyebb, mint az MS2 Scan. A végső, optimalizált értékek az 5. táblázatban találhatóak.

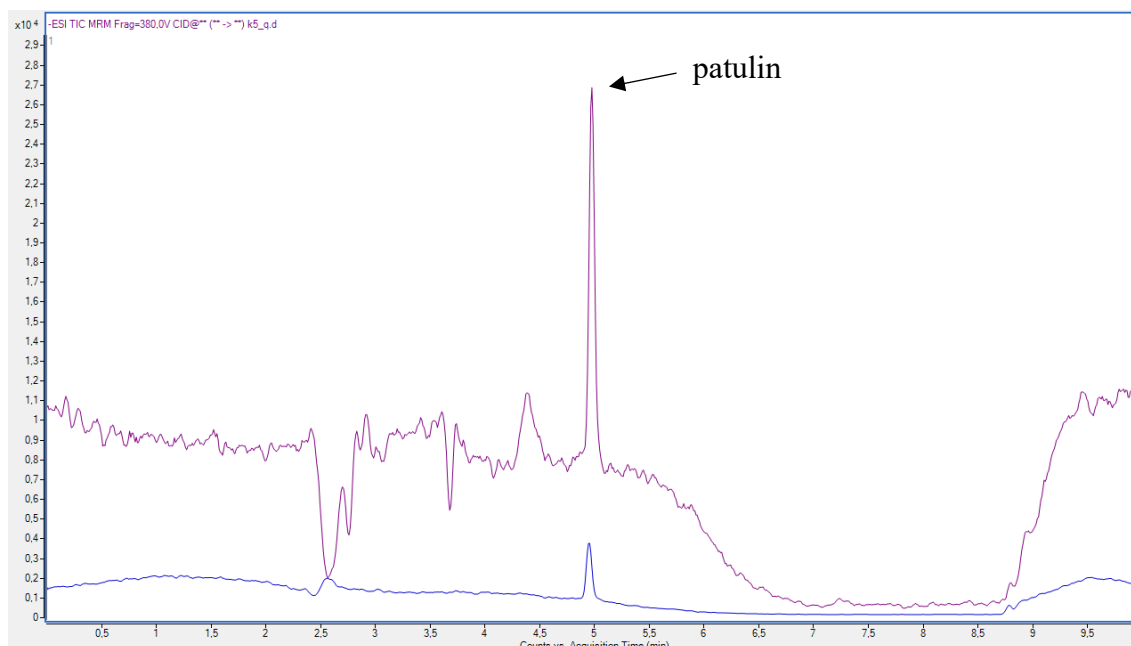
**5. táblázat:** A tömegspektrométer optimalizált beállításai

Prekurzor ion tömege	152,9 Da
Termék ionok tömegei	108,7; 80,7; 52,7 Da
Ion forrás	ESI
Polaritás	Negatív
Ütközési energia	1; 3; 8 V
Dwell	150 ms
Gáz hőmérséklete	300 °C
Gáz sebessége	8 l/min
Nebulizer	35 psi
Kapilláris feszültség	5500 V
deltaEMV (-)	1100 V

#### 4.1 Megfelelő eluens-összetétel és kolonna kiválasztása

Az UTC módszerben leírt kromatográfias oszlophoz hasonló polaritású kolonna került beszerzésre, név szerint egy Avantor ACE Excel fenilezett C18-as (150 x 4,6 mm). A kolonnában a szilika alapvázhoz fenilgyűrűk kapcsolódnak, melyeknek köszönhetően  $\pi$ - $\pi$  és dipól-dipól kölcsönhatások is részt vesznek a retencióban, hiszen a patulin a poláris lakton gyűrűje és kettős kötése miatt képes ezek kialakítására. Ezen kívül egy másik, egy HALO 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm-es kolonnán is történtek tesztmérések, mely a gyártó szerint a hagyományos C18 kolonnájukhoz képest növelt polaritással rendelkezik és alkalmas 100% vizes mobil fázisok esetén, mely tulajdonság hasznos volt a megfelelő gradiens kikísérletezésében. A tesztekhez kalibrációs pontokat készítettem elő, egyrészt, hogy lássam a kisebb koncentrációkhoz tartozó kromatogramokat, másrészt ezek esetében még nem beszélhetünk mátrixhatásról, ezért az optimalizálást célszerűbb ezekkel végezni. A tesztmérések során azt tapasztaltam, hogy az módszerben leírt eluensekkel és az Avantor ACE kolonnával mért kalibrációs pont esetében a csúcsterület kicsi, az alapvonal pedig „dombos”. Felmerült az az ok, hogy szennyeződés kerülhetett a mérésbe vagy a készülékből, vagy a kolonnáról egy előző mérés alkalmával. A mérést megismételtem egy másik műszeren is, és ebben az esetben is ugyanazt tapasztaltam. A kolonna szennyezettségének kiküszöbölésére

tiszta acetonitrillel, ezt követően acetonitril:víz 1:1 arányú eleggyel mostam az oszlopot 1-1 órán keresztül, majd indítottam egy tesztmérést, ennek kromatogramjai az 1. ábrán láthatók egy 98 ng/ml-es kalibrációs pont esetében.



**1. ábra:** A 98 ng/ml-es patulin kalibrációs pont kromatogramjai egymásra vetítve, oszlopmosás előtt (kék, alsó) és után (lila, felső) mérve

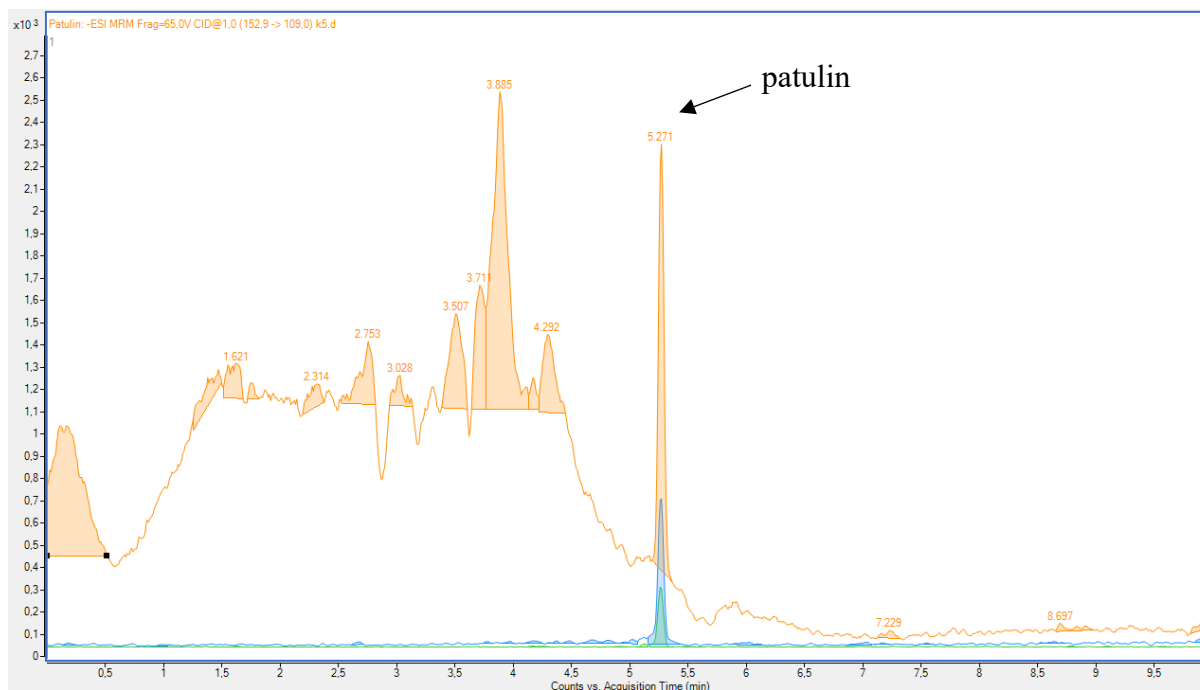
Mivel a kolonna mosása nem hozta meg a remélt eredményt, új eluens-összetételekkel kezdtem el kísérletezni. A legtöbb szakirodalomban ecetsavval elegyítik az egyik, vagy mindkét mozgó fázist, főként ultratiszta (Type I.) vizet és acetonitrilt. Emellett az új kísérletekbe bevontam egy másik, Halo típusú C-18-as kolonnát is. A méréseket egy 98 ng/ml-es kalibrációs ponton teszteltem. Az eredményeket a következő táblázat foglalja össze (6. táblázat).

**6. táblázat:** Az eluens-összetételekkel és kolonnákkal való tesztmérések eredményei egy 98 ng/ml-es patulin kalibrációs ponton

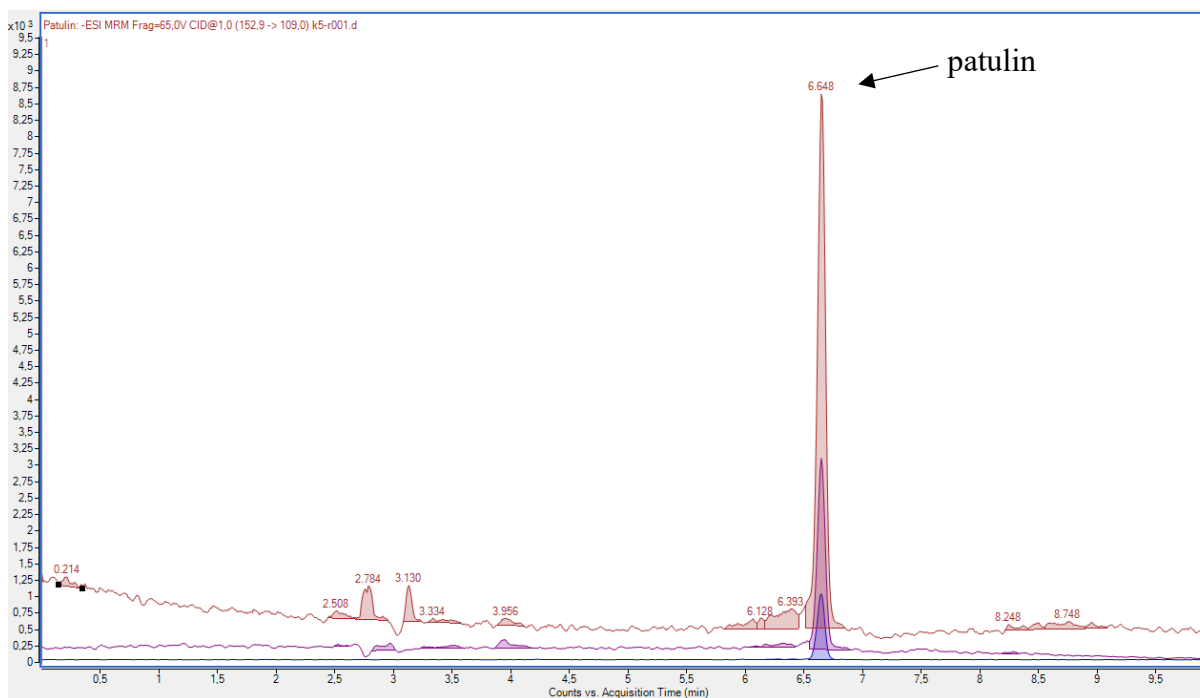
	Eluensek		Avantor Ace kolonna		Halo kolonna	
	„A” eluens	„B” eluens	Konc. [µg/kg]	Terület	Konc. [µg/kg]	Terület
1. összetétel	Type I. víz	ACN	0	0	0	0
2. összetétel	0,1% ecetsav/Type I. víz	ACN	1,62	6963	4,73	41614
3. összetétel	0,1% ecetsav/Type I. víz	0,1% ecetsav/ACN	6,26	58570	5,09	45569

A mérésekből megállapítható, hogy tiszta víz és acetonitril esetében a patulin nem eluálódik megfelelően. Ecetsav hozzáadásával azonban már igen, sőt, a csúcsterületek nagyságát is növeli, különösen, ha mindkét eluensben jelen van, vagyis stabil a koncentrációja a gradiensben. A különböző eluens-összetételek hatása az Avantor Ace kolonnán történt mérések esetén figyelhető meg a legjobban, hiszen a 2. és 3. összetétellel mért kalibrációs pont területe között majdnem egy nagyságrendnyi eltérés van. Az új eluens-összetételeknek következtében nem csak a csúcsterületek javultak, de az alapvonal is egyenletesebb lett, mely a 2. ábrán is jól látható. A javuló csúcsterületek magyarázata lehet, hogy a gyengén savas közeg javítja az ESI során keletkező cseppek vezetőképességét, ami finomabb, stabilabb permetet eredményezett, ezen kívül az ecetsav anionja segíti a minta deprotonálódását (Hua & Jenke, 2012). A kolonnák összehasonlításánál pedig az állapítható meg, hogy a 2. eluens-összetétel esetében a Halo oszlopon nagyobb területű csúcsok jönnek létre, mint az Avantor ACE-en, míg a 3. összetételnél ez megfordul, bár a különbség ebben az esetben nem jelentős. Mivel a validáláshoz a 3. összetételt szerettem volna használni, a mérések alapján (a csúcsalakokat is figyelembe véve) mindkét kolonna megfelelőnek bizonyult, végül az élettartamukat tekintve a Halo kolonnára esett a választás.

a)



b)



**2. ábra:** Egy 98 ng/ml-es patulin kalibrációs pont különböző eluensekkel mért kromatogramjainak összehasonlítása. Az a) alábrán a mozgó fázis víz és acetonitril, az MRM-eket a következő színek jelzik: sárga a 109,0 Da (területe 6442), a kék a 80,9 Da, a zöld az 53,0 Da. A b) alábrán a mozgó fázisok 0,1% ecetsavas víz és acetonitril MRM-eket a következő színek jelzik: piros a 109,0 Da (területe 36735), a lila a 80,9 Da, a kék az 53,0 Da. Mindkét mérés az Avantor ACE kolonnán történt.

Annak érdekében, hogy megbízhatóan mérhessük azokat a kisebb koncentrációkat is, amelyek a kalibrációban szerepelnek, szükség van arra, hogy a csúcsterületeket megnöveljük, amihez az injektálási térfogatot 5-ről 15 µl-re növeltem. Ehhez összeállítottam egy injektorprogramot, mely során a mintából való injektálások között vizet injektálunk a mintákhoz a következőképpen: 5 µl víz, 3 µl minta, túmosás, 5 µl víz, 5 µl minta, túmosás, 5 µl víz, 5 µl minta, túmosás, 5 µl víz, 2 µl minta, túmosás. A gradiens ennél a módszernél 0 perc: 30% B eluens, 0-1 perc: 30% B eluens, 1-8 perc: 95% B eluens, 8-8,1 perc: 95% B eluens. A következő táblázat a 15 µl minta injektálásának eredményeit foglalja össze injektorprogrammal és anélkül (7. táblázat).

**7. táblázat:** 15 µl minta eredményeinek összehasonlítása injektorprogrammal és anélkül, különböző kolonnákon

Injektálás módja (15 µl minta)	Avantor Ace kolonna		Halo kolonna	
	Konc. [µg/kg]	Terület	Konc. [µg/kg]	Terület
Injektorprogram nélkül	5,66	51882	5,19	46731
Injektorprogrammal	140,83	1556884	153,17	1694295

Az adatokból megállapítható, hogy az injektorprogram javított a csúcsterület nagyságán. Ennek oka, hogy a patulin oldat túl erős oldószerben, tiszta acetónitrilben van, ezért nincs visszatartása a patulinnak a kolonna elején, inkább „elmosódik” rajta, és így kisebb csúcsot ad. A kolonnákat összehasonlítva pedig injektorprogramot használva a Halo kolonna jobban szerepelt. Összességében tehát a validáláshoz a Halo kolonnára, valamint az injektorprogramra esett a választás a fent említett gradiens elúcióval, valamint 0,1% ecetsavas víz és 0,1% ecetsavas acetónitril mobil fázisokkal.

## 4.1 Tesztmérés mintamátrixokkal

A következő lépésként az előbbieken felsorolt mintamátrixokat készítettem elő QuEChERS módszerrel. A mérést során igyekeztem „tisztaság” alapján felállítani a szekvenciát, hogy az összetettebb mátrixok ne szennyezzék el a mérés elejét (mérési sorrend: almalé, bébiétel, paradicsompüré, szárított alma, almás pite, gesztenyepüré). A kiértékelés során beírtam a pontos beméréseket és az extrahálószer térfogatát, majd kiintegráltam a mintákhoz tartozó csúcsokat. A szoftver a kalibrációs pontokhoz beállított koncentrációkhoz rendeli azok csúcsterületeit, melyekből egy egyenest állít, és ez alapján számolja ki a mintákhoz tartozó csúcsterületek alapján azok koncentrációit. Ezen túl az alábbi képlet segítségével számítja a patulin koncentrációját a mintában:

$$c_m = \frac{c_o * D * V_{extr}}{m}$$

ahol:

$c_m$	a patulin koncentrációja a mintában [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
$c_o$	a patulin koncentrációja a mintaoldatban [ $\text{ng}/\text{ml}$ ]
$D$	hígítás
$V_{extr}$	extrahálószer mennyisége [ $\text{ml}$ ]
$m$	a bemért minta tömege [ $\text{g}$ ]

A minták nagy része nem tartalmazott eredendően patulint, kivéve a szárított almát. A mérési eredményeket a 8. táblázat foglalja magában. Az eredményekből visszanyerést számoltam, mely azt mutatja meg, hogy az addicionált mintában a mért koncentráció hány százaléka a névlegesen hozzáadott analit koncentrációnak. A visszanyerés számtásához használt képlet az alábbi:

$$\eta = \left( \frac{c_{sp} - c_m}{c_{elm}} \right) * 100$$

ahol:

$\eta$	visszanyerés [%]
$c_{sp}$	az addicionált minta mért koncentrációja [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
$c_m$	a minta mért koncentrációja [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
$c_{elm}$	a mintához névlegesen hozzáadott analit mennyisége [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]

A 8. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy legjobb visszanyerése a megközelítőleg 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  szinten adalékolt gesztenyepüré mintának, a legalacsonyabb pedig a megközelítőleg 10

$\mu\text{g/kg}$ -ra spike-olt paradicsompüré lett. Befolyásolhatta az eredményt a paradicsompüré esetében, hogy jött szennyező csúcs a patulin csúcsával átfedésben, illetve a szárított alma esetében az, hogy alapvetően is tartalmazott patulint.

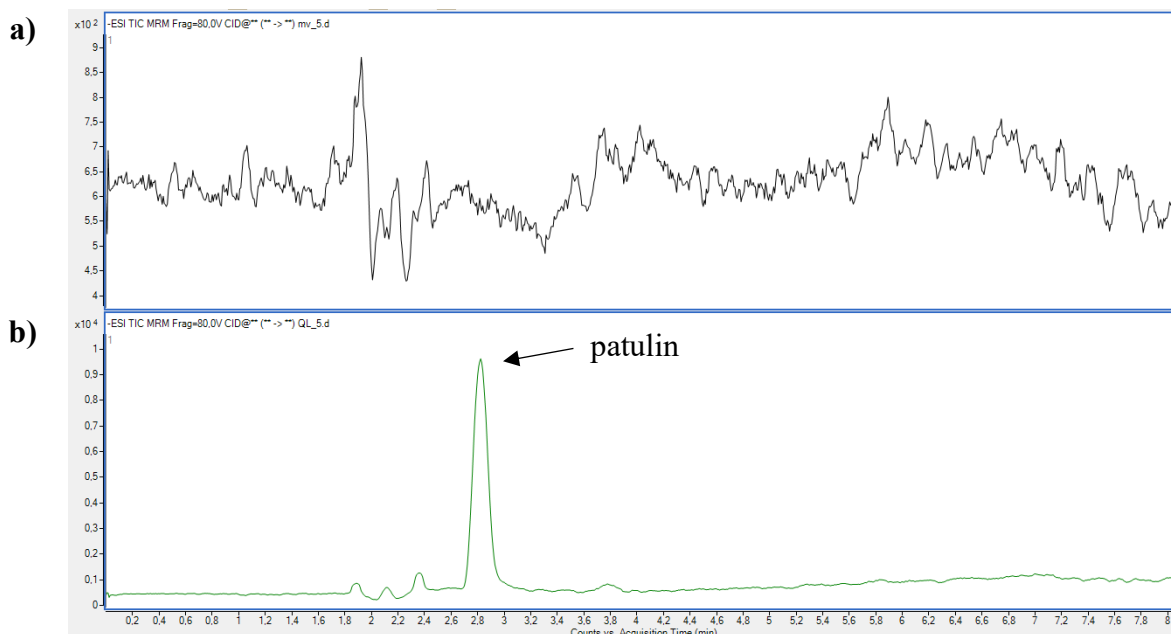
**8. táblázat:** A mátrix tesztmérések során kapott területek, koncentrációk és visszanyerések

Minta	Névleges spike szint [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Terület	Végső koncentráció [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Visszanyerés
almalé	-	0	0	-
almalé (sp1)	5	33291	3,97	82%
almalé (sp2)	50	345681	31,66	65%
gesztenyepüré	-	0	0	-
gesztenyepüré (sp1)	5	15180	4,68	96%
gesztenyepüré (sp2)	50	162364	31,1	64%
szárított alma	-	22319	12,03	-
szárított alma (sp)	10	35762	16,8	49%
paradicsompüré	-	0	0	-
paradicsompüré (sp)	10	33041	3,96	40%
bébiétel	-	0	0	-
bébiétel (sp)	10	41954	4,73	49%
almás pite	-	0	0	-
almás pite (sp)	10	26073	6,57	68%

## 4.2 Validálás

### 4.2.1 Specifikusság

A validálás egyik fontos paramétere a specifikusság ellenőrzése, ennek egy módja melyhez módszervakot készítettem elő, vagyis egy olyan mintát, mely nem tartalmaz mérendő anyagot, de a mintaelőkészítési folyamaton ugyanúgy végigmegy, mint az éles minták. Cél, hogy bebizonyítsuk, az eszközeink, vegyszereink nem tartalmaznak olyan szennyezést, amely a minták kiértékelését zavarja. Egy módszervak és egy LOQ szinten adalékolt minta kromatogramját hasonlítottam össze, mely alapján igazolható, hogy a mintaelőkészítés során nem kerül szennyező a mérésbe (3. ábra).



**3. ábra:** Az a) alábrán egy módszervak, a b) alábrán egy patulin standard oldattal, LOQ (5 µg/kg) szinten adalékolt almalé minta kromatogramja látható.

#### 4.2.2 Alsó méréshatár, jel/zaj arány meghatározása

A tervezett alsó méréshatár 5 µg/kg. Cél annak igazolása, hogy az alsó méréshatáron adalékolt minta csúcsa kellően kiemelkedik a zajból, vagyis a csúcsmagasság és a zajszint aránya nagyobb, mint 10. A MassHunter szoftver automatikusan kiszámolja az egyes kromatogramokhoz tartozó jel/zaj arányokat, ezeket az alábbi, 9. táblázat foglalja össze az öt párhuzamos LOQ szinten adalékolt minta esetében. Mivel a jel/zaj arányok minden esetben meghaladják a 10-es értéket, biztosan állíthatjuk, hogy az alsó méréshatár megfelelően mérhető.

**9. táblázat:** Az LOQ szinten adalékolt mintákhoz tartozó jel/zaj arányok

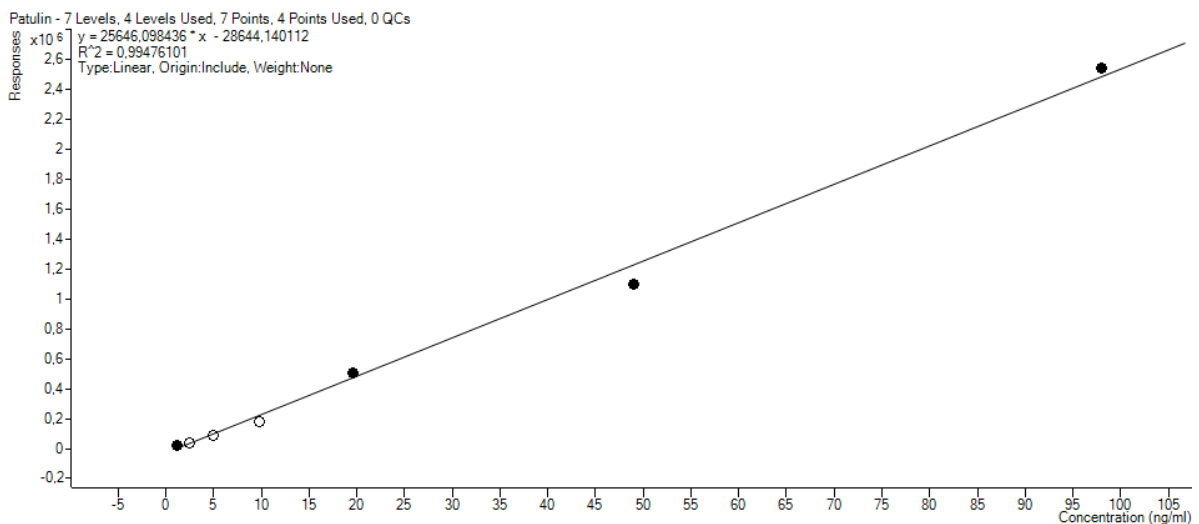
Minta	Jel/Zaj
QL_1	25,08
QL_2	20,28
QL_3	23,11
QL_4	18,76
QL_5	22,55

### 4.2.3 Linearitás

Cél annak igazolása, hogy a kalibrációs pontok területei és koncentrációi között lineáris kapcsolat áll fenn az adott koncentrációtartományon belül (ez esetben 1,23 – 98,0 ng/ml). A linearitás egyik kritériuma, hogy az egyenes determinációs együtthatója ( $R^2$ ) 0,99 feletti. A MassHunter szoftver által létrehozott, azonos súlyú pontokra illesztett kalibrációs egyenes a 4. ábrán látható. Mivel a kapott  $R^2$  érték 0,9947, ezen kritérium szempontjából lineárisnak tekinthető az összefüggés a kalibrációs pontokhoz tartozó csúcsterületek és a koncentrációk között.

Kalibrációs egyenes egyenlete:  $y = 25646,0984 * x - 28644,1401$

Determinációs együttható ( $R^2$ ): 0,9947

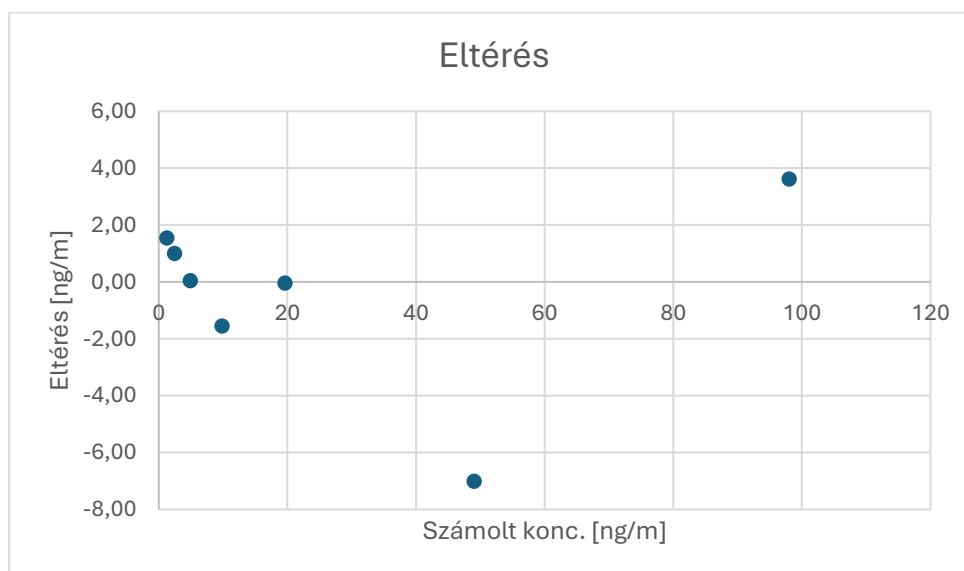


**4. ábra:** A patulin kalibrációs pontok csúcsterületei (y-tengely, ábrán: responses) és a hozzájuk tartozó koncentrációk (x-tengely, concentration (ng/ml)) ábrázolása, valamint a rájuk illesztett kalibrációs egyenes.

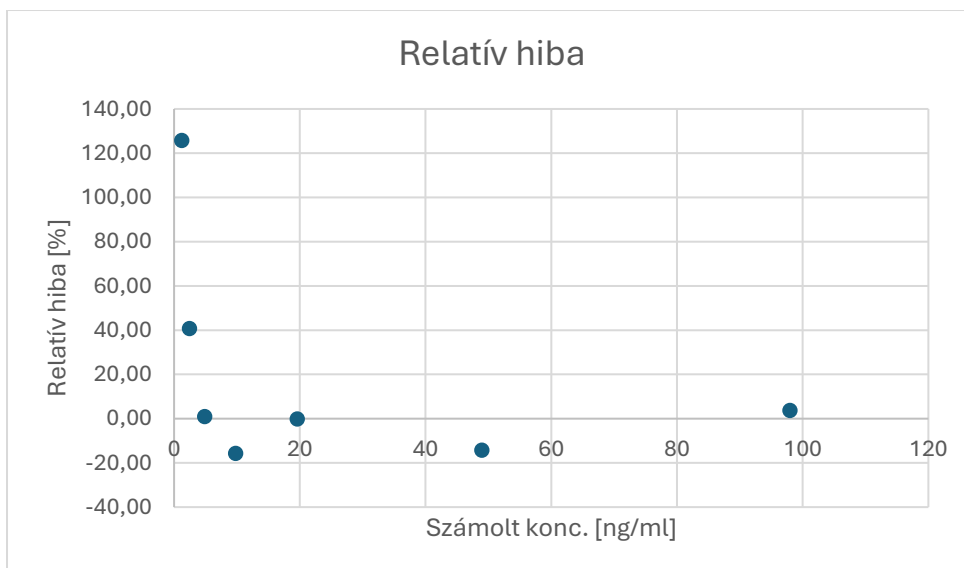
A 10. táblázat a standard oldat koncentrációja alapján számolt kalibrációs pontok koncentrációját hasonlítja össze a pontokra illesztett egyenes egyenletével számolt „becsült” értékekkel. A két koncentráció közötti eltérést az 5. ábra, a számolt koncentrációhoz viszonyított eltérést, azaz relatív hibát a 6. ábra szemlélteti. Az első és a második kalibrációs pont relatív hibája nem felel meg a DG SANTE-féle validációs kritériumoknak, mivel minden pont esetében max. 20% relatív hiba engedhető meg ezen típusú linearitási vizsgálat esetében.

**10. táblázat:** A patulin kalibrációs pontok számolt és becsült értékei, a közöttük lévő eltérés és relatív hiba

Szint	Számolt konc. [ng/ml]	Becsült konc. [ng/ml]	Eltérés [ng/ml]	Relatív hiba [%]
k1	1,23	2,78	1,55	125,66
k2	2,45	3,45	1,00	40,66
k3	4,9	4,94	0,04	0,84
k4	9,8	8,25	-1,55	-15,78
k5	19,6	19,56	-0,04	-0,19
k6	49,0	41,99	-7,01	-14,30
k7	98,0	101,62	3,62	3,69



**5. ábra:** A patulin kalibrációs pontok számolt koncentrációi és az illesztett egyenessel becsült értékek közötti eltérés



**6. ábra:** A patulin kalibrációs pontok esetében a számolt koncentrációk és a koncentrációhoz viszonyított eltérés, vagyis a relatív hiba

Az első diagramról leolvasható, hogy a legnagyobb eltérés a számolt és becsült koncentrációk között a 6. és 7. kalibrációs pont esetében van. A második diagramon viszont az látható, hogy az eltérések a koncentrációkhoz viszonyítva inkább az alacsonyabb szintek esetében jelentős. A hibák elkerülésére javasolt a térfogatok bemérésénél Hamilton fecskendő használata automata pipetta helyett, hiszen utóbbi vizes oldatokra van kalibrálva, valamint az acetonitril alacsony felületi feszültségük miatt hajlamosak a pipettahegyből kicsöpögni, így nagy eséllyel nem a pontos térfogat fog a standard oldatból a kalibráló oldatba kerülni.

#### 4.2.4 Visszanyerés

Az analittól mentes almalé mintákat két szinten adalékoltam, a tervezett alsó méréshatáron (LOQ) és annak négyszeresén, 5-5 párhuzamosban. Cél, hogy az elméleti koncentrációkat összehasonlítsuk a mért koncentrációkkal, és megállapítsuk, hogy az analitikai mérésünk a hozzáadott analit mennyiségét milyen mértékben tudja visszamérni. A számításhoz használt képlet a 4.1-es fejezetben található. Az eredményeket a 11. táblázat foglalja magában. A 401/2006/EK rendelet szerint a 20 µg/kg koncentráció alatt az elfogadott visszanyerés 50-120%, mely kritériumnak megfelelnek a kapott értékek.

**11. táblázat:** A névlegesen 5 és 20 µg/kg szinten, 196 ng/ml-es patulin oldattal adalékolt párhuzamos minták számolt és mért koncentrációi, valamint a visszanyeréseik

Minta	Bemérés [g]	Névleges sp. szint [µg/kg]	Számolt sp. szint [µg/kg]	Mért koncentráció [µg/kg]	Visszanyerés [%]
QL_1	10,00	5	4,90	5,52	112,75
QL_2	10,07	5	4,87	5,33	109,63
QL_3	10,00	5	4,90	5,47	111,69
QL_4	10,05	5	4,88	5,36	109,92
QL_5	10,05	5	4,88	5,50	112,75
4xQL_1	10,05	20	19,50	13,73	70,39
4xQL_2	10,06	20	19,48	13,65	70,04
4xQL_3	10,00	20	19,60	13,75	70,17
4xQL_4	10,00	20	19,60	13,85	70,66
4xQL_5	10,03	20	19,54	13,97	71,50

#### 4.2.5 Ismételhetőség

A fent leírtak szerint előkészített almálé minták eredményeiből a teljes analitikai folyamat (előkészítés és műszeres mérés) ismételhetősége is megállapítható. A mért koncentrációkból először átlagot számolunk az alábbi képlet segítségével:

$$\bar{x}_c = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n c_i$$

ahol:

$\bar{x}_c$	A minták mért koncentrációinak átlaga [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
n	A mérések száma [db]
$c_i$	Az egyes mért koncentrációk [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]

A kapott átlageredmény segítségével szórást számolunk az alábbi képlettel:

$$s_c = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{x}_c)^2}{n - 1}}$$

ahol

$s_c$	A mért koncentrációk szórása [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
$c_i$	Az egyes mért koncentrációk [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
$\bar{x}_c$	A minták mért koncentrációinak átlaga [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
n	A mérések száma [db]

A mért koncentrációk átlagából és szórásából relatív szórást számolunk, melyből következtethetünk az ismételhetőségre. A kapott eredményeket a 12. táblázat tartalmazza.

$$RSD_r \% = \frac{s_c}{\bar{x}_c} * 100$$

ahol:

$RSD_r$	Az ismételhetőség relatív szórása [%]
$s_c$	A mért koncentrációk szórása [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
$\bar{x}_c$	A mért koncentrációk átlaga [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]

**12. táblázat:** A névlegesen 5 és 20 µg/kg szinten, 196 ng/ml-es patulin oldattal adalékolt párhuzamos minták mért koncentrációi, azok átlaga, szórása és relatív szórása

Minta	Mért konc. [µg/kg]	Minta	Mért konc. [µg/kg]
QL_1	5,52	4xQL_1	13,73
QL_2	5,33	4xQL_2	13,65
QL_3	5,47	4xQL_3	13,75
QL_4	5,36	4xQL_4	13,85
QL_5	5,50	4xQL_5	13,97
Átlag [µg/kg]	5,44	Átlag [µg/kg]	13,79
Szórás [µg/kg]	0,09	Szórás [µg/kg]	0,12
Relatív szórás [%]	1,57	Relatív szórás [%]	0,89

Az Európai Unió 401/2006/EK rendelete szerint patulin esetében 20 µg/kg alatti szinten az elvárt relatív szórás ( $RSD_r \leq 30\%$ ), mely kritériumnak megfeleltek a számolt adatok.

## 5 Összefoglalás

Célunk egy olyan patulin kvantitatív mérésére alkalmas módszer fejlesztése és validálása, melyet összetettebb mátrixok mérése esetén tudunk alkalmazni megerősítésre, vagy akár a jelenlegi módszer kiváltására. A jelenlegi módszerünkben etil-acetát alapú eleggyel történik az extrakció, melyet kisózás, SPE oszlopozás és bepárlás, majd visszaoldás követ. A QuEChERS mintaelőkészítés során acetonitrillel extrahálunk, MgSO<sub>4</sub>-tal és NaCl-dal víztelenítünk, majd az extraktumból 1 ml-t dSPE csőben tisztítunk 150 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg PSA, 50 mg C18 és 7,5 mg GCB-vel. A QuEChERS előkészítés előnye, hogy kevésbé körülményes, kevesebb eszközt igényel, egyszerűbb és gyorsabb.

Munkám során a United Chemical Technologies Determination of Patulin in Processed Foods Using QuEChERS Extraction and UHPLC-MS/MS Analysis módszerével kezdtem el dolgozni, majd a továbbiakban szakirodalmakból gyűjtött információk alapján folyamatosan optimalizáltam a mérést. A legjobb eredményeket végül a következő módosításokkal értem el; 0,1% ecetsavval elegyített acetonitrilt alkalmaztam az extrakcióhoz a mintaelőkészítésben, a mérést pedig 0,1% ecetsavas MilliQ víz és 0,1% ecetsavas acetonitril eluensekkel, HALO 90 Å AQ-C18 150 x 4,6 mm-es kolonnával végeztem egy Aglient 1200 HPLC-hez kapcsolt 6410-es hármas kvadrupól tömegspektrométerrel.

Különböző, az elmúlt években előforduló, patulin vizsgálatra beküldött élelmiszertípusokon teszteltem először a mérést, melyek a következők voltak; szűrt almalé, almaalapú bébiétel, paradicsompüré, szárított alma, gesztenyepüré, almás pite. A mintaelőkészítés során egy minta és addicionált minta készült, az almaléhoz és gesztenyepüréhez kétszintű, a többihez egyszintű spike-ot készítettem. A biztató eredmények után elkészítettem a validáláshoz a mérést; öt módszervakot, öt LOQ szinten (5 µg/kg) addicionált és öt, az LOQ szint négyszeresén (20 µg/kg) addicionált mintát az almaléből. Az eredményeket az Európai Unió 401/2006/EK rendeletében leírt követelményekkel hasonlítottam össze, mely során a specifikusság, alsó méréshatár (jel/zaj arány), linearitás és ismételhetőség igazolása történt meg. A módszer tehát alkalmas zöldség- és gyümölcsstermékek patulin tartalmának meghatározására QuEChERS mintaelőkészítési és HPLC-MS/MS mérési módszerrel.

## 6 Irodalomjegyzék

1. Babaali, E., Abbasi, A., & Sarlak, Z. (2017). *Risks of Patulin and Its Removal Procedures: A Review*.
2. Câmara, J. S., Fernandes, P., Barros, N., & Perestrelo, R. (2023). An Improved Analytical Approach Based on  $\mu$ -QuEChERS Combined with LC-ESI/MS for Monitoring the Occurrence and Levels of Patulin in Commercial Apple Juices. *Separations*, 10(3), 149. <https://doi.org/10.3390/separations10030149>
3. Cunha, S. C., Faria, M. A., & Fernandes, J. O. (2009). Determination of patulin in apple and quince products by GC–MS using 13C5–7 patulin as internal standard. *Food Chemistry*, 115(1), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.074>
4. Desmarchelier, A., Mujahid, C., Racault, L., Perring, L., & Lancova, K. (2011). Analysis of Patulin in Pear- and Apple-Based Foodstuffs by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7659–7665. <https://doi.org/10.1021/jf201461r>
5. Gal, T., Alexa, E., Dascălu, I., & Iordănescu, O. (2024). A review of patulin, “the mycotoxin of apples”, and its methods of detection. *JOURNAL of Horticulture*, 28.
6. Gaspar, E. M. S. M., & Lucena, A. F. F. (2009). Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry*, 114(4), 1576–1582. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.097>
7. Hua, Y., & Jenke, D. (2012). Increasing the Sensitivity of an LC-MS Method for Screening Material Extracts for Organic Extractables via Mobile Phase Optimization. *Journal of Chromatographic Science*, 50(3), 213–227. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmr049>
8. Ioi, J., Zhou, T., Tsao, R., & F. Marcone, M. (2017). Mitigation of Patulin in Fresh and Processed Foods and Beverages. *Toxins*, 9(5), 157. <https://doi.org/10.3390/toxins9050157>
9. Kuptsova, M., Shchepak, A., Slis, A., & Solodovnik, T. (2022). DETERMINATION OF PATULIN IN APPLE PUREE USING LC-MS WITH TRIPLE QUADRUPOLE DETECTOR. *WATER AND WATER PURIFICATION TECHNOLOGIES. SCIENTIFIC AND TECHNICAL NEWS*, 32(1), 3–9. <https://doi.org/10.20535/2218-930012022260948>
10. Malachová, A., Sulyok, M., Beltrán, E., Berthiller, F., & Krska, R. (2014). Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of Chromatography A*, 1362, 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.037>
11. Marsol-Vall, A., Delpino-Rius, A., Eras, J., Balcells, M., & Canela-Garayoa, R. (2014). A Fast and Reliable UHPLC-PDA Method for Determination of Patulin in

- Apple Food Products Using QuEChERS Extraction. *Food Analytical Methods*, 7(2), 465–471. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9648-y>
12. Notardonato, I., Gianfagna, S., Castoria, R., Ianiri, G., De Curtis, F., Russo, M. V., & Avino, P. (2021). Critical review of the analytical methods for determining the mycotoxin patulin in food matrices. *Reviews in Analytical Chemistry*, 40(1), 144–160. <https://doi.org/10.1515/revac-2021-0131>
  13. Sadok, I., Stachniuk, A., & Staniszevska, M. (2019). Developments in the Monitoring of Patulin in Fruits Using Liquid Chromatography: An Overview. *Food Analytical Methods*, 12(1), 76–93. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1340-9>
  14. Sadok, I., Szmagara, A., & Krzyszcak, A. (2023). Validated QuEChERS-based UHPLC-ESI-MS/MS method for the postharvest control of patulin (mycotoxin) contamination in red-pigmented fruits. *Food Chemistry*, 400, 134066. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134066>
  15. Sadok, I., Szmagara, A., & Staniszevska, M. M. (2018). The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. *Food Chemistry*, 245, 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.093>
  16. Shinde, R., Dhanshetty, M., Lakade, A., Elliott, C. T., & Banerjee, K. (2021). Development and validation of a liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the analysis of patulin in apple and apple juice. *Mycotoxin Research*, 37(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00422-2>
  17. Vaclavikova, M., Dzuman, Z., Lacina, O., Fenclova, M., Veprikova, Z., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2015). Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC–MS/MS analytical procedure. *Food Control*, 47, 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.064>
  18. Valle-Algarra, F. M., Mateo, E. M., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo-Castro, R., & Jiménez, M. (2009). Optimization of clean-up procedure for patulin determination in apple juice and apple purees by liquid chromatography. *Talanta*, 80(2), 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.040>
  19. Vidal, A., Ouhibi, S., Ghali, R., Hedhili, A., De Saeger, S., & De Boevre, M. (2019). The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.048>
  20. WHO, Food safety, 2024, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (letöltés: 2025.10.26.)
  21. 2023/915 Európai Unió rendelet az élelmiszerekben előforduló egyes szennyező anyagok felső határértékeiről

22. 401/2006/EK Európai Uniói rendelet az élelmiszerek mikotoxintartalmának hatósági ellenőrzéséhez használandó mintavételi és elemzési módszerek megállapításáról
23. 882/2004/EK Európai Uniói rendelet a takarmány- és élelmiszerjog, valamint az állat-egészségügyi és az állatok kíméletére vonatkozó szabályok követelményeinek történő megfelelés ellenőrzésének biztosítása céljából végrehajtott hatósági ellenőrzésekről
24. Agilent Technologies, Creating an MS2 Scan Method for Triple Quadrupole LC/MS System with MassHunter 10 or Earlier, 2024, <https://community.agilent.com/knowledge/mass-spec-software-portal/kmp/mass-spec-software-articles/kp1326.creating-an-ms2-scan-method-for-triple-quadrupole-lc-ms-system-with-masshunter-10-or-earlier>, (letöltés: 2025.10.26)
25. Agilent Technologies, Creating an MS2 SIM Method for Triple Quadrupole LC/MS System with MassHunter 10 or Earlier, 2024, <https://community.agilent.com/knowledge/mass-spec-software-portal/kmp/mass-spec-software-articles/kp1325.creating-an-ms2-sim-method-for-triple-quadrupole-lc-ms-system-with-masshunter-10-or-earlier>, (letöltés: 2025.10.26.)
26. United Chemical Technologies, Determination of Patulin in Processed Foods Using QuEChERS Extraction and UHPLC-MS/MS Analysis, 2023, [https://www.unitedchem.com/wp-content/uploads/2016/05/Patulin\\_In\\_Processed\\_Foods\\_Application\\_Note\\_2023-1.pdf](https://www.unitedchem.com/wp-content/uploads/2016/05/Patulin_In_Processed_Foods_Application_Note_2023-1.pdf) (letöltés: 2025.10.26.)
27. Eurofins Food & Feed Testing Budapest Kft., LME-17-12 Minőségirányítási eljárás, Mérési Bizonytalanság becslése, 2023

**MATE Szervezeti és Működési Szabályzat**

**III. Hallgatói Követelményrendszer**

**III.1. Tanulmányi és Vizsgaszabályzat**

**6.13. sz. függelék: A MATE egységes szakdolgozat /  
diplomadolgozat / záródolgozat / portfólió készítési útmutatója**

**4.2. sz. melléklete: Nyilatkozat a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió nyilvános hozzáféréseiről és eredetiségéről (módosítva: 2025. október 16.)**

**NYILATKOZAT**

**a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréseiről és  
eredetiségéről**

A hallgató neve:	Páli Petra
A Hallgató Neptun kódja:	HREXS3
A dolgozat címe:	Mintaelőkészítési módszer validálása patulin vizsgálatához, különböző élelmiszermintákból, folyadékkromatográfiás, tandem tömegspektrometriás méréshez
A megjelenés éve:	2025.
A konzulens intézetének neve:	Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Élelmiszerkémia és Analitika Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem. Továbbá kijelentem, hogy a dolgozat elkészítése során alkalmazott mesterséges intelligencia-eszközök (pl. szövegenerálás, nyelvi javítás, fordítás, adatelemzés) használata nem helyettesítette a saját kutatási és alkotói munkámat, azok alkalmazását a források között vagy a módszertani részben feltüntettem, és a szakmai-etikai elvárásoknak megfelelően jártam el.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlant állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemitulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Budapest, 2025. 11. 03.

  
Hallgató aláírása

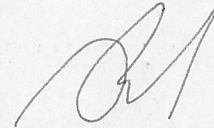
## NYILATKOZAT

Páli Petra (hallgató Neptun azonosítója: HREXS3) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom<sup>1</sup>.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem\*<sup>2</sup>

Kelt: Budapest, 2025. 11. 03.



---

Dr. Abrankó László  
belső konzulens

---

<sup>1</sup> A megfelelő aláhúzendó.

<sup>2</sup> A megfelelő aláhúzendó.

# Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

## 1. Általános adatok

Hallgató neve:	Páli Petra
Neptun-kódja:	HREXS3
Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):	<input type="checkbox"/> BSc/BA <input checked="" type="checkbox"/> MSc/MA <input type="checkbox"/> Doktori (PhD) <input type="checkbox"/> Egyéb: .....
Tantárgy neve/kódja*:	
A munka címe:	Mintaelőkészítési módszer validálása patulin vizsgálatához, különböző élelmiszermintákból, folyadékromatográfiás, tandem tömegspektrometriás méréshez

\* doktori értekezés esetén nem kitöltendő

## 2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)

B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Kérjük, töltsse ki a vonatkozó táblázatokat!)

## 3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

### I. TÁBLÁZAT: Asszisztensi vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrekció, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)
Fordítás, ötletelés	Chat GPT 5	Irodalmi rész

### II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka mellékletében való csatolása szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott eszköz verziója, elérhetősége	MI-neve,	Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-naplót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma

### 3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

*Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.*

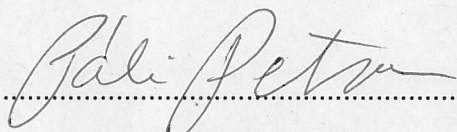
Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

-

### 4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: Budapest, 2025. 11. 04.



Hallgató aláírása



Dr. Abrankó László

Belső konzulens